

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-340078

(43)Date of publication of application : 11.12.2001

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
 C12N 1/21
 C12P 7/62
 //(C12N 1/21
 C12R 1:05)
 (C12P 7/62
 C12R 1:05)

(21)Application number : 2000-164584

(71)Applicant : KANEGAFUCHI CHEM IND CO LTD
 INST OF PHYSICAL & CHEMICAL
 RES

(22)Date of filing : 01.06.2000

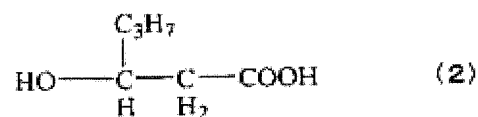
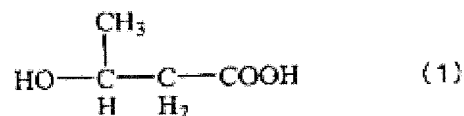
(72)Inventor : YOKOMIZO SATOSHI
 FUKUCHI TAKESHI
 ODAWARA OSAMU
 MATSUMOTO KEIJI
 DOI YOSHIHARU

(54) METHOD FOR PRODUCING POLYESTER

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for producing a polyester by which the molar fraction of 3-hydroxyhexanoic acid (3HH) is controlled and a copolyester P [3-hydroxybutyric acid (3HB)-co-3HH] having various molar fractions of the 3HH is stably produced with high productivity.

SOLUTION: This method is to produce the copolyester P (3HB-co-3HH) in which the 3HB represented by the following formula (1) is copolymerized with the 3HH represented by the following formula (2) using a microorganism and the method for producing the polyester comprises using any of a combination of oils and fats different in number of carbons, a combination of fatty acids different in the number of carbons or a combination of the oils and fats with the fatty acids different in the number of carbons as at least two kinds of carbon sources and thereby collecting the polyester different in the molar fraction of the 3HH.



* NOTICES *

JP0 and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

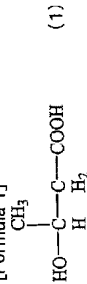
- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.*** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

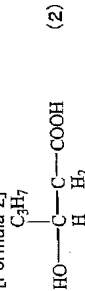
[Claim(s)]

[Claim 1]It is the method of producing copolymerized polyester P (3 HB-co-3HH) which carries out copolymerization of the 3-hydroxyhexanoic acid shown using a microorganism with 3-hydroxybutyric acid shown with a following formula (1), and a following formula (2). Combination of fats and oils in which carbon numbers differ as at least two sorts of carbon sources, combination of fatty acid in 3HH molar fractions differ. Or a manufacturing method of polyester extracting polyester in which differ in a carbon number.

[Formula 1]



[Formula 2]



[Claim 2]A manufacturing method of the polyester according to claim 1 which controls 3HH molar fraction by changing an addition of fats and oils or fatty acid used as a carbon source.

[Claim 3]A manufacturing method of the polyester according to claim 1 or 2 which is fats and oils chosen from a group which said fats and oils become from palm oil, palm oil, palm kernel oil, and hexanoic acid triglyceride.

[Claim 4]A manufacturing method of the polyester according to claim 1 or 2 which is fatty acid chosen from a group which said fatty acid becomes from saturation which is 6-10 or unsaturated fatty acid, its fatty acid ester, and fatty acid salt in a carbon number.

[Claim 5]A manufacturing method of polyester given in any 1 paragraph of Claims 1-4, wherein 3HH molar fraction of said polyester is 1-40-mol%.

[Claim 6]A manufacturing method of polyester given in any 1 paragraph of Claims 1-5 which are the microorganisms transformed by recombinant vector containing a polyester polymerase gene from which said microorganism was isolated from Aeromonas KYABIE (Aeromonas caviae).

[Claim 7]A manufacturing method of polyester given in any 1 paragraph of Claims 1-6, wherein said microorganism is Alcaligenes eutrophus (Ralstonia eutropha).

[Translation done.]

* NOTICES *

JP0 and INPII are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. *** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the manufacturing method by the production by fermentation of copolymerized polyester. In detail, it is related with the manufacturing method of plastic Mr. Polymer Division disassembled in response to an operation of a microorganism under natural environment (inside of the inside of the ground, a river, and the sea).

[0002]

[Description of the Prior Art] Accumulating polyester into a biomass as an energy storage substance in many microorganisms by the present is known. The example of representation is Poly 3-hydroxybutyric acid (it abbreviates to P (3HB) hereafter). P (3HB) is a thermoplastic polymer and attracts attention as an environment-friendly green plastic from being biologically decomposed in natural environment. However, an application range is restricted practical from P (3HB) having hard and weak character, since crystallinity is high. For this reason, research aiming at improvement of this character has been made.

[0003] In it, the manufacturing method of the copolymer P (3 HB-co-3HV) which becomes JP, S57-150393, A, JP, S59-220192, A, etc. from 3-hydroxybutyric acid (3HB) and 3-hydroxyvaleric acid (3HV) is indicated. It was thought that it was applicable to a broad use since this P (3 HB-co-3HV) is rich in pliability compared with P (3HB). Like the manufacturing method of P (3HB), the manufacturing method of the copolymer in these gazettes proliferates a biomass in the preceding paragraph, restricts nitrogen or Lynn in the latter part, cultivates a microorganism, and manufactures a copolymer.

[0004] About P (3 HB-co-3HV), since pliability changes as the molar fraction of 3HV increases, the research which controls the molar fraction of 3HV has also been made. For example, propionic acid is used in JP, S57-150393, A and JP, S63-269899, A. A propan-1-ol is used, the molar fraction of 3HV is controlled by JP, H7-79705, B by changing the addition to the inside of those culture media, and P (3 HB-co-3HV) whose 3HV molar fraction is 10-90-mol% is manufactured by it. However, since its pliability required of change of the physical properties accompanying it being scarce, and using it especially for a film etc. does not improve as a matter of fact even if P (3 HB-co-3HV) makes 3HV molar fraction increase, it was used only for the field of hard Plastic solids, such as a shampoo bottle and a handle of a disposable razor.

[0005] In recent years, research was made about two-ingredient copolymerized polyester [of 3HB and 3-hydroxyhexanoic acid (it abbreviates to 3HH hereafter)] P (3 HB-co-3HH), and a manufacturing method for the same. For example, it is indicated to JP, H5-93049, A and JP, H7-265065, A, respectively. Production by fermentation of the manufacturing method of P (3 HB-co-3HH) copolymer of these gazettes is carried out from fats and oils, such as fatty acid, such as oleic acid, and an olive oil, using Aeromonas KYABIE (Aeromonas caviae) which isolated from soil.

[0006] The research on the character of P (3 HB-co-3HH) is also made (Y. Doi, S. Kitamura, H. Abe, Macromolecules 28-4822-4823 (1995)). In this report, a carbon number cultivates A. caviae for fatty acid of the single kind of the 12 or more fatty acid as an only carbon source, and 3HH is carrying out production by fermentation of 11-19-mol% of the P (3 HB-co-3HH). It was shown clearly that this P (3 HB-co-3HH) comes to show flexible character gradually from character hard P (3HB) and weak according to the increase in 3HH molar fraction, and the pliability which exceeds P (3 HB-co-3HV) was shown.

http://www4.ipdl.inpit.go.jp/cgi-bin/tran_web.cgi_ejie?atw_u=http%3A%2F%2Fwww4.ipdl.i... 2010/08/02

[0007] Cloning of the PHA synthase gene of A. caviae is carried out, The report which produces P (3 HB-co-3HH) by making fatty acid into a carbon source was made using the recombination stock which introduced this gene into Alcaligenes eutrophus which accumulates P (3HB) not less than 90%. (T. Fukui, Y. doi, J. Bacteriol. vol. 179, No. 15-4821-4830, JP H10-108682, A) In this, It is reported that P (3 HB-co-3HH) whose 3HH molar fraction is 10-20-mol% is producible by making sodium octanoate into a carbon source.

[0008] Thus, if 3HH molar fraction can be controlled for this polymer in the wide range and a copolymer can be manufactured, It becomes possible [production by fermentation] even for a soft copolymer from a hard copolymer, and the application to a field broad to that of which pliability, such as thread and a film, is required from that of which hardness is required like the case of television can be expected. However, by these methods, the productivity of a biomass is low and it cannot apply as a production method towards utilization of this polymer. As mentioned above, it is indispensable to control and produce 3HH molar fraction of P (3 HB-co-3HH) in order to apply to a broad field. Then, the production method which holds high microbial-cell-production nature and polymer content, and can control 3HH molar fraction was called for.

[0009]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] In view of the above-mentioned actual condition, this invention controls 3HH molar fraction, and an object of this invention is to provide the manufacturing method of the polyester which is high productivity, and is stabilized and manufactures P (3 HB-co-3HH) which has various 3HH molar fractions.

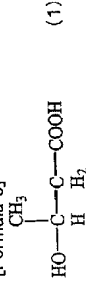
[0010]

[Means for Solving the Problem] It succeeded in manufacturing a copolymer in which this invention persons cultivate a microorganism which accumulates P (3 HB-co-3HH) copolymer using a culture medium which makes a carbon source fats and oils and/or fatty acid as a result of performing various examination, they hold high productivity, and it is stabilized and 3HH molar fractions differ.

[0011] Namely, using a microorganism, this invention is copolymerized polyester P (3 HB-co-3HH) which carries out copolymerization of the 3-hydroxyhexanoic acid shown with 3-hydroxybutyric acid shown with a following formula (1), and a following formula (2) the method of producing, and as at least two sorts of carbon sources. It is a manufacturing method of polyester which extracts polyester in which 3HH molar fractions differ by using either combination of fats and oils in which carbon numbers differ, combination of fatty acid in which carbon numbers differ or combination of fats and oils and fatty acid which differ in a carbon number.

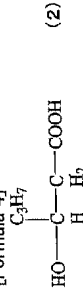
[0012]

[Formula 3]



[0013]

[Formula 4]



[0014] The gist of this invention the microorganism which accumulates P (3 HB-co-3HH) copolymer as at least two sorts of carbon sources. The combination of the fats and oils in which carbon numbers differ, the combination of the fatty acid in which carbon numbers differ, By or the thing to cultivate by the culture medium which added either of the combination of the fats and oils and fatty acid which differ in a carbon number. P (3 HB-co-3HH) copolymer of the range whose 3HH molar fraction is 1-40-mol% is stored up into a biomass, and it is related with the manufacturing method of the copolymer polyester extracting polymer from the culture. Below, the details of this invention are explained.

[0015]

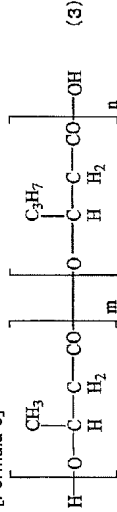
[Embodiment of the Invention] The manufacturing method of polyester of this invention is applied when producing copolymerized polyester P (3 HB-co-3HH) which carries out copolymerization of the

http://www4.ipdl.inpit.go.jp/cgi-bin/tran_web.cgi_ejie?atw_u=http%3A%2F%2Fwww4.ipdl.i... 2010/08/02

3-hydroxyhexanoic acid shown by the 3-hydroxybutyric acid shown by the above-mentioned formula (1), and the above-mentioned formula (2) using a microorganism. Copolymerized polyester P (3 HB-co-3HH) which carries out copolymerization of the 3-hydroxyhexanoic acid shown by the 3-hydroxybutyric acid shown by the above-mentioned formula (1) and the above-mentioned formula (2) is shown in a following general formula (3), for example.

[0016]

[Formula 5]



[0017]or [the inside of a formula, and / that m and n are the same] — or it differs and one or more integers are expressed. The microorganism in particular used in the manufacturing method of polyester of this invention does not have restriction. Although bacteria, such as an Alcaligenes (Ralstonia) group deposited with the depository institutions (for example, IFO, ATCC, etc.) of the strain, an Aeromonas group, an Escherichia group, can be used, It is preferred to use Alcaligenes eutrophus (Ralstonia eutropha).

[0018]As for a microorganism used for a manufacturing method of polyester of this invention, it is preferred that it is the microorganism transformed by recombinant vector containing a polyester polymerase gene. When producing a transformant, a plasmid vector which may be independently increased within the bacillus can be used for a vector, but it may be included in a chromosome. The polyester polymerization gene should just have a manifestation unit which functions by host bacteria other than a structural gene, such as a promoter and a terminator. A polyester polymerization gene used in a manufacturing method of polyester of this invention has a preferred gene which isolated from Aeromonas KYABIE (Aeromonas caviae), for example, gene fragments indicated to JP,H10-108682,A can be used.

[0019]In order to introduce a recombinant vector into a microorganism, it can carry out by a publicly known method. For example, the calcium process (Lederberg,E.M.et al, J.Bacteriol.119.1072 (1974)) and the electroporation method (one volume) 1.8.4 pages, 1994, etc. can be used.

[0020](Manufacturing method of polyester) In a manufacturing method of polyester of this invention, Combination of fats and oils in which carbon numbers differ as at least two sorts of carbon sources as mentioned above when cultivating a microorganism, combination of fatty acid in which carbon numbers differ, Or a culture medium including a nitrogen source, mineral, and other sources of organotrophic which are nutrients other than a carbon source can be used using either of the combination of fats and oils and fatty acid which differ in a carbon number. Fats and oils from which the above-mentioned carbon number differs mean fats and oils in which carbon numbers of main fatty acid differ among fatty acid which constitutes fats and oils. Although the culture temperature should just be the temperature which can grow the bacillus, it is preferred 40 ** from 20 **. Although there is no restriction in particular in culture time, about one to seven days may be sufficient. Then, what is necessary is just to collect polyester from this acquired culture object or a culture. When using a transformant, antibiotics, such as kanamycin corresponding to a resistance gene which exists during culture at a vector, ampicillin, and a tetracycline, may be added.

[0021]Combination of fats and oils in which carbon numbers differ as at least two sorts of carbon sources in a manufacturing method of polyester of this invention, combination of fatty acid in which carbon numbers differ, Or polyester in which 3HH molar fractions differ is extracted by using either of the combination of fats and oils and fatty acid which differ in a carbon number.

[0022]There is no restriction in particular in fats and oils used as a carbon source, for example, constituent fatty acids 52% of linoleic acid, Soybean oil which is 21% of oleic acid, 12% of palmitic acid, 11% of linolenic acid, and 3% of stearic acid, Constituent fatty acids 59% of oleic acid, 22% of linoleic acid, 11% of linolenic acid, Rapeseed oil and constituent fatty acids which are 4% of palmitic acid and 2% of stearic acid 51% of linoleic acid, Corn oil which is 35% of oleic acid, 11% of palmitic acid, and 2% of stearic acid, Constituent fatty acids 75% of oleic acid, 10% of linoleic acid, 10% of palmitic acid, Olive oil and constituent fatty acids which are 3% of stearic acid and 1% of linolenic acid 43% of palmitic acid, Palm oil which is 41% of oleic acid, 10% of linoleic acid, 5% of stearic acid, and 1% of myristic acid,

Constituent fatty acids 47% of lauric acid, 18% of myristic acid, 9% of palmitic acid, Palm oil which is 7% of oleic acid, 3% of stearic acid, and 2% of linoleic acid, Fats and oils of natural product origin of palm kernel oil etc. whose constituent fatty acids are 44% of lauric acid, 17% of oleic acid, 14% of myristic acid, 3% of palmitic acid, and 3% of linoleic acid, and a carbon number Six or more fatty acid [20 or less], for example, hexanoic acid, octanoic acid, decanoic acid, Triglyceride, diglyceride, monoglyceride, etc. which were compounded from fatty acid chosen from lauric acid etc. one or more less fatty acid as constituent fatty acids, and contain it 40 to 50% with fats and oils of natural product origin are preferred. About compound triglyceride, diglyceride, and monoglyceride, hexanoic acid of constituent fatty acids is preferred.

[0023]In a manufacturing method of polyester of this invention, it is preferred to use fats and oils chosen from a group which consists of palm oil, palm oil, palm kernel oil, and hexanoic acid triglyceride as the above-mentioned fats and oils. As the above-mentioned fatty acid, fatty acid derivatives, such as ester, fatty acid salt, etc. of saturation, such as hexanoic acid, octanoic acid, decanoic acid, lauric acid, oleic acid, palmitic acid, linoleic acid, linolenic acid, and myristic acid, or unsaturated fatty acid, and these fatty acid, are mentioned. Especially, fatty acid in which a carbon number is chosen from a group which consists of saturation which is 6-10 or unsaturated fatty acid, its fatty acid ester, and fatty acid salt is preferred.

[0024]In order to obtain polyester with high 3HH molar fraction, it is preferred to use fats and oils containing fatty acid with as much as possible few carbon numbers and fatty acid. Palm oil, palm kernel oil, hexanoic acid triglyceride, etc. which contain comparatively many fatty acid whose carbon numbers are 12 or less with fats and oils are preferred, and saturation whose carbon numbers are 6-10 in fatty acid or unsaturated fatty acid, its fatty acid ester, and fatty acid salt are preferred. Also in saturation whose carbon numbers are 6-10 or unsaturated fatty acid, its fatty acid ester, and fatty acid salt, a thing of a carbon number of even pieces is more preferred, and especially hexanoic acid of the carbon number 6 is preferred.

[0025]In a manufacturing method of polyester of this invention, it is preferred to control 3HH molar fraction by changing an addition of fats and oils or fatty acid used as a carbon source. If fats and oils of natural origin are made into a carbon source, P (3 HB-co-3HH) whose 3HH molar fraction is smaller than 10-mol% is producible. What is necessary is just to add fatty acid of the carbon numbers 6-10 or its triglyceride, diglyceride, and monoglyceride, in order to produce P (3 HB-co-3HH) with larger 3HH molar fraction than 10-mol%.

[0026]Combination of fats and oils in which carbon numbers differ as at least two sorts of carbon sources as mentioned above in a manufacturing method of polyester of this invention, combination of fatty acid in which carbon numbers differ, Or 3HH molar fraction of polyester obtained is controllable between 1-40-mol% using either of the combination of fats and oils and fatty acid which differ in a carbon number by changing an addition of the above-mentioned fats and oils or fatty acid.

[0027]In a manufacturing method of polyester of this invention, there is no restriction in particular as the addition method of of fats and oils and/or fatty acid which are carbon sources. However, fats and oils may reduce dissolved oxygen concentration in culture medium, if it adds in large quantities at once. Since fatty acid has cytotoxicity, growth inhibition may be started. Therefore, a method of dividing quantity of a grade which does not start growth inhibition as these addition methods, and adding, a method of maintaining concentration which carries out continuation addition using a peristaltic pump etc., and does not start growth inhibition, etc. are preferred. When dividing and adding, concentration of fatty acid added at once is not restricted in particular with less than 1 w/v% and fats and oils, although less than 5 w/v% is preferred. Although the total amount of fats and oils and fatty acid to add should just be a grade which does not affect growth of a selected microorganism and less than its 20 w/v% is preferred, it is not restricted in particular. Although it may add with a separate line, since a direction which mixed fats and oils and fatty acid and was added when there was compatibility can reduce an addition line, fats and oils and fatty acid have it. [preferred]

[0028]As a nitrogen source, peptone, a meat extract, a yeast extract, etc. besides ammonium salt, such as ammonia, ammonium chloride, ammonium sulfate, and ammonium phosphate, are mentioned, for example. As mineral, potassium primary phosphate, potassium secondary phosphate, magnesium phosphate, magnesium sulfate, sodium chloride, etc. are mentioned, for example.

[0029]As other sources of organotrophic, vitamins, for example, vitamin B₁, such as amino acid, for example, a glycine, an alanine, serine, threonine, and proline, vitamin B₁₂, vitamin C, etc. are mentioned.

[0030]In this invention, the recovery from a biomass of polyester can use following methods, for example. It is made to dry, after it separates a biomass from culture medium after an end of culture using a centrifuge etc. and distilled water, methanol, etc. wash the biomass. Polyester is extracted from this dried cell using organic solvents, such as chloroform. Filtration etc. remove a cell component from an organic solvent solution having contained this polyester, poor solvents, such as methanol and hexane, are added to that filtrate, and polyester is settled. By filtration or centrifugal separation, supernatant liquid is removed, it is made to dry and polyester is collected. Analysis of obtained polyester is conducted with gas chromatography, a nuclear magnetic resonance method, etc., for example.

[0031]

[Example]Hereafter, working example explains this invention still more concretely. However, this invention does not limit the technical scope to these working example.

[0032](Working example 1) 13 shares (T. — Fukui, Y.Doi, Appl MicrobiolBiotechnol., 49,333-336, and (1998).) of Alcaligenes eutrophus PHB-4/pJRDDEE32d Accession number FERM P-15786 (it omits 13 shares of followings Aed) was cultivated as follows. The presentation of the front culture medium was set to 1 w/v%Meat-extract, 1 w/v%Bacto-Trypton, 0.2 w/v%Yeast-extract, 0.9w/v%

Na₂HPO₄and12H₂O, 0.15w/v%KH₂PO₄, and (pH 6.7). The presentation of a polyester production culture medium 1.1w/v%Na₂HPO₄and12H₂O, 0.19w/v%KH₂PO₄, 0.6w/v%(NH₄)₂SO₄, 0.1w/v%

MgSO₄and7H₂O, and 0.5 v/v% trace element salting in liquid (0.1N chloride — 1.6w/v%FeCl₃and6H₂O.) 1w/v%CaCl₂and2H₂O, 0.02w/v%CoCl₂and6H₂O, 0.016w/v%CuSO₄and5H₂O, 0.012w/v%NiCl₂and6H₂O, What melted 0.01 w/v%CrCl₃ and 6H₂O. It was considered as kanamycin 2 w/v% pro extract AP-12

(BANSHU CHOMIRYO) and 5x10⁻⁶w/v%. The carbon source was used only as fats and oils, and added palm oil, palm-kernel-oil, or palm oil 4 w/v% in 3 steps.

[0033]The glycerol stock of 13 shares of Aed(s) was inoculated into the front culture medium, it cultivated for 20 hours, and 1.5 v/v% inoculation was carried out at 10L jar fermenter (B.E. MARUBISHI MD-500 type) into which the production culture medium of 6L was put. The operating condition was made into the culture temperature of 30 **, 400 rpm of agitating speed, and quantity-of-airflow 1.8 L/min, and pH was controlled between 6.6 and 6.8. 5-N sulfuric acid and sodium hydroxide were used for control. Culture was performed till 72 hours. By centrifugal separation, biomasses were collected, with methanol, after washing, it freeze-dried and dry cell weight was measured.

[0034]2 ml of sulfuric acid-methanol mixture (15:85) and 2 ml of chloroform were added and sealed to about 30 mg of obtained dried cells, and the methyl ester of the polyester decomposition product in a biomass was obtained by heating for 140 minutes at 100 **. 1 ml of distilled water was added to this bilayer, the lower layer organic solvent layer was taken out and capillary gas chromatography analyzed the presentation. The gas chromatograph used Shimadzu GC-17A and the capillary column used NEUTRA BOND-1 (the column length of 25 m, column 0.25 mm in inside diameter, 0.4 micrometer of liquid membrane thickness) by GL Sainsu-Sha. Temperature up of the temperature conditions was carried out the speed for 8 **/from the initiation temperature of 100 **. The obtained result is shown in Table 1.

[0035]

[Table 1]

炭素源	菌体量 (g/L)	ポリマー含量 (wt%)	3相分離率 (mol%)	ポリマー生産性 (g/L)
パーム油	35.6	35.9	5.4	12.8
ヤシ油	38.6	64.0	8.6	24.7
パーム核油	37.6	34.9	8.2	13.1

[0036]This result showed improving to about 24 g/L, when productivity made palm oil a carbon

source. When productivity improved, unlike the result of a description, it turned out that 3HH molar fraction becomes smaller than 10-mol% at JP.H10-108682A.

[0037](Working example 2) As a carbon source, 1 palm-oil 5 w/v%, 2 palm-oil 4 w/v% and hexanoic acid 1 w/v%. 3) The rate was variously changed with palm oil 3 w/v%, hexanoic acid 2 w/v% and 4 palm-oil 2 w/v%, hexanoic acid 3 w/v% and 5 palm-oil 1 w/v%, hexanoic acid 4 w/v% and 6 palm-oil 0.5 w/v%, and hexanoic acid 5 w/v%, and fats and oils and fatty acid were added. Palm oil carried out 0.5 w/v addition of the palm oil at the time of inoculation, mixed the remaining palm oil and hexanoic acid, and carried out continuation addition with the peristaltic pump at the rate of about 10 ml/min before 24 to 60 hours. It analyzed by cultivating on same culture medium and the conditions as working example 1 except it. The result is shown in Table 2.

[0038]

[Table 2]

炭素源(w/v%)	菌体量 (g/L)	ポリマー含量 (wt%)	3相分離率 (mol%)	ポリマー生産性 (g/L)
ヤシ油	45.0	45.0	8.1	28.1
ヘキサノ酸	0.0	62.5	9.9	27.3
ヤシ油	1.0	42.9	63.7	10.5
ヘキサノ酸	3.5	41.4	54.3	22.5
ヤシ油	2.0	34.3	41.1	15.8
ヘキサノ酸	3.0	36.5	36.6	18.5
ヤシ油	1.0	4.0	18.5	9.6
ヘキサノ酸	0.5	5.0	生着せず	—

[0039]It turned out that 3HH molar fraction increases to 8.1-32-mol% as the rate of hexanoic acid increased from this result to 0 - 4 w/v%.

[0040](Working example 3) Palm oil 4 w/v% and hexanoic acid triglyceride (HTG) 1 w/v% were used as a carbon source. 5 w/v% addition of the case of only palm oil was carried out. The same culture medium as working example 1 was used, and it cultivated using 3L jar fermenter (B.E. MARUBISHI MDL-300 type) into which the production culture medium of 1.8L was put. The operating condition was made into the culture temperature of 30 **, 550 rpm of agitating speed, and quantity-of-airflow 1.8 L/min, and controlled pH by 5-N sulfuric acid and sodium hydroxide between 6.6 and 6.8. At the time of inoculation, 0.5 w/v% addition was carried out, the remaining palm oil and HTG were mixed, palm oil was equally divided into three, and it added in after-inoculation 24 and 36 or 48 hours. Culture was performed till 72 hours. By centrifugal separation, biomasses were collected, with methanol, after washing, it freeze-dried and dry cell weight was measured. The same analysis as working example 1 was conducted. The result is shown in Table 3.

[0041]

[Table 3]

炭素源	菌体量(g/L)	ポリマー含量(wt%)	3相分離率(mol%)
ヤシ油	49.9	66.1	7.3
ヤシ油+HTG	39.9	56.5	9.8

[0042]This result showed that 3HH molar fraction improved, when a part of carbon source was changed into HTG.

[0043](Working example 4) The same culture medium as working example 1 and the jar fermenter were used, and it cultivated by the same operating condition. The carbon source mixed hexanoic acid 0.5 w/v% or octanoic acid 0.5 w/v% to palm oil 4 w/v%, and carried out continuation addition like working example 1. 5 w/v% addition of the case of only palm oil was carried out. An analysis result is shown in Table 4.

[0044]

[Table 4]

炭素源	菌体量(g/L)	ポリマー含量(wt%)	3相分離率(mol%)
ヤシ油	49.9	66.1	7.3
ヤシ油+ヘキサノ酸	45.5	57.2	8.6
ヤシ油+オクタノ酸	39.8	51.1	9.0

[0045]The polymer from which 3HH molar fraction differs was obtained from this result by changing

the fatty acid to add.

[0046]

[Effect of the Invention] By this invention, 3HH molar fraction to which P (3 HB-co-3HH) copolymer which is biodegradable polymer changes physical properties a lot is arbitrarily controlled in the 1-40-mol% of range, it becomes possible high productivity and to stabilize and produce, and this large polymer of an application range can be provided now.

[Translation done.]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-340078

(P2001-340078A)

(43)公開日 平成13年12月11日(2001. 12. 11)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームコード(参考)
C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 1/21	4 B 0 2 4
1/21		C 1 2 P 7/62	4 B 0 6 4
C 1 2 P 7/62		(C 1 2 N 1/21	4 B 0 6 5
// (C 1 2 N 1/21		C 1 2 R 1:05)	
C 1 2 R 1:05)		(C 1 2 P 7/62	
審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 7 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2000-164584(P2000-164584)	(71)出願人	000000941 鐘淵化学工業株式会社 大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号
(22)出願日	平成12年6月1日(2000. 6. 1)	(71)出願人	000006792 理化学研究所 埼玉県和光市広沢2番1号
		(72)発明者	横溝 聡 兵庫県神戸市垂水区塩屋町6-31-17三青荘
		(72)発明者	福地 健 兵庫県明石市朝霧町3-123セゾン朝霧304
		(74)代理人	100086586 弁理士 安富 康男 (外2名)
		最終頁に続く	

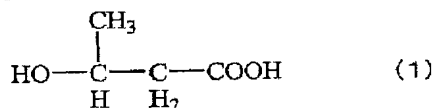
(54)【発明の名称】 ポリエステルの製造方法

(57)【要約】

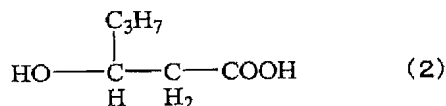
【課題】 3HHモル分率を制御し、様々な3HHモル分率を有するP(3HB-co-3HH)を高い生産性でかつ安定して製造するポリエステルの製造方法を提供する。

【解決手段】 微生物を用いて、下記式(1)で示される3-ヒドロキシ酪酸と下記式(2)で示される3-ヒドロキシヘキサン酸とを共重合してなる共重合体ポリエステルP(3HB-co-3HH)を生産する方法であって、少なくとも2種の炭素源として、炭素数の異なる油脂の組み合わせ、炭素数の異なる脂肪酸の組み合わせ、又は、炭素数の異なる油脂と脂肪酸との組み合わせのいずれかを用いることによって、3HHモル分率の異なるポリエステルを採取するポリエステルの製造方法。

【化1】



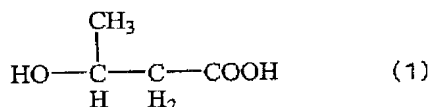
【化2】



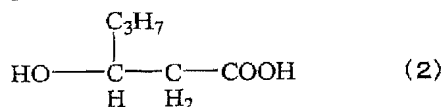
【特許請求の範囲】

【請求項1】 微生物を用いて、下記式(1)で示される3-ヒドロキシ酪酸と下記式(2)で示される3-ヒドロキシヘキサン酸とを共重合してなる共重合ポリエステルP(3HB-co-3HH)を生産する方法であって、少なくとも2種の炭素源として、炭素数の異なる油脂の組み合わせ、炭素数の異なる脂肪酸の組み合わせ、又は、炭素数の異なる油脂と脂肪酸との組み合わせのいずれかを用いることによって、3HHモル分率の異なるポリエステルを採取することを特徴とするポリエステルの製造方法。

【化1】



【化2】



【請求項2】 炭素源として用いる油脂または脂肪酸の添加量を変えることによって、3HHモル分率を制御する、請求項1記載のポリエステルの製造方法。

【請求項3】 前記油脂がヤシ油、パーム油、パーム核油及びヘキサン酸トリグリセリドからなる群より選択される油脂である請求項1又は2記載のポリエステルの製造方法。

【請求項4】 前記脂肪酸が炭素数が6~10である飽和または不飽和脂肪酸、その脂肪酸エステル及び脂肪酸塩からなる群より選択される脂肪酸である請求項1又は2記載のポリエステルの製造方法。

【請求項5】 前記ポリエステルの3HHモル分率が1~40mol%であることを特徴とする請求項1~4のいずれか1項に記載のポリエステルの製造方法。

【請求項6】 前記微生物がアエロモナス・キャビエ(*Aeromonas caviae*)より単離されたポリエステル重合酵素遺伝子を含む組換えベクターにより、形質転換された微生物である請求項1~5のいずれか1項に記載のポリエステルの製造方法。

【請求項7】 前記微生物が*Alcaligenes eutrophus*(*Ralstonia eutropha*)であることを特徴とする請求項1~6のいずれか1項に記載のポリエステルの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は共重合ポリエステルの発酵生産による製造方法に関する。詳しくは、自然環境(土中、河川、海中)の下で、微生物の作用を受けて分解するプラスチック様高分子の製造方法に関するもの

である。

【0002】

【従来の技術】現在までに数多くの微生物において、エネルギー貯蔵物質としてポリエステルを菌体内に蓄積することが知られている。その代表例がポリ-3-ヒドロキシ酪酸(以下、P(3HB)と略す)である。P(3HB)は熱可塑性高分子であり、自然環境中で生物的に分解されることから、環境にやさしいグリーンプラスチックとして注目されている。しかし、P(3HB)は結晶性が高いため、硬くて脆い性質を持っていることから実用的には応用範囲が限られる。この為、この性質の改良を目的とした研究がなされてきた。

【0003】その中で、特開昭57-150393号公報および特開昭59-220192号公報などに3-ヒドロキシ酪酸(3HB)と3-ヒドロキシ吉草酸(3HV)とからなる共重合体P(3HB-co-3HV)の製造方法が開示されている。このP(3HB-co-3HV)はP(3HB)に比べると柔軟性に富むため、幅広い用途に応用できると考えられた。これらの公報における共重合体の製造方法は、P(3HB)の製造方法と同様に、前段で菌体を増殖させ、後段で窒素またはリンを制限して微生物を培養し、共重合体を製造するものであった。

【0004】またP(3HB-co-3HV)については、3HVのモル分率が増えるにつれて柔軟性が変化することから、3HVのモル分率を制御する研究もなされてきた。例えば、特開昭57-150393号公報、特開昭63-269989号公報ではプロピオン酸を使用し、また特公平7-79705号公報ではプロパン-1-オールを使用し、それらの培地中への添加量を変えることにより3HVのモル分率を制御しており、3HVモル分率が10~90mol%のP(3HB-co-3HV)が製造されている。しかしながら、実際のところP(3HB-co-3HV)は3HVモル分率を増加させても、それに伴う物性の変化が乏しく、特にフィルムなどに使用するのに要求される柔軟性が向上しないため、シャンプーボトルや使い捨て剃刀の取手など硬質成形体の分野にしか利用されなかった。

【0005】近年、3HBと3-ヒドロキシヘキサン酸(以下、3HHと略す)との2成分共重合ポリエステルP(3HB-co-3HH)およびその製造方法について研究がなされた。たとえば、特開平5-93049号公報および特開平7-265065号公報にそれぞれ記載されている。これらの公報のP(3HB-co-3HH)共重合体の製造方法は、土壌より単離されたアエロモナス・キャビエ(*Aeromonas caviae*)を用いてオレイン酸等の脂肪酸やオリーブオイル等の油脂から発酵生産するものであった。

【0006】また、P(3HB-co-3HH)の性質に関する研究もなされている(Y. Doi, S. Kit

amura, H. Abe, *Macromolecules* 28, 4822-4823 (1995)). この報告では炭素数が12個以上の脂肪酸のうちの単一種の脂肪酸を唯一の炭素源として *A. caviae* を培養し、3HHが11~19mol%のP(3HB-co-3HH)を発酵生産している。このP(3HB-co-3HH)は3HHモル分率の増加にしたがって、P(3HB)の硬くて脆い性質から次第に柔軟な性質を示すようになり、P(3HB-co-3HV)を上回る柔軟性を示すことが明らかにされた。

【0007】また、*A. caviae*のPHAシンターゼ遺伝子をクローニングし、この遺伝子をP(3HB)を90%以上蓄積する *Alcaligenes eutrophus* に導入した組換え株を用いて、脂肪酸を炭素源としてP(3HB-co-3HH)を生産する報告がなされた。(T. Fukui, Y. doi, *J. Bacteriol.* vol. 179, No. 15, 4821-4830, 特開平10-108682号公報) このなかで、オクタン酸ナトリウムを炭素源とすることで、3HHモル分率が10~20mol%のP(3HB-co-3HH)が生産できると報告している。

【0008】このように、本ポリマーを3HHモル分率を広い範囲でコントロールして共重合体を製造することができれば、硬い共重合体から柔らかい共重合体まで発酵生産可能となり、テレビの筐体などのように硬さを要求されるものから糸やフィルムなどのような柔軟性を要求されるものまで、幅広い分野への応用が期待できる。しかしながら、これらの方法では菌体の生産性が低く、本ポリマーの実用化に向けた生産方法としては適用できない。上述したように、P(3HB-co-3HH)の3HHモル分率をコントロールして生産することは、幅広い分野へ応用するために必要不可欠である。そこで高い菌体生産性とポリマー含量とを保持し、かつ3HHモル分率をコントロールできる生産方法が求められていた。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記現状に鑑み、3HHモル分率を制御し、様々な3HHモル分率を有するP(3HB-co-3HH)を高い生産性でかつ安定して製造するポリエステルの製造方法を提供することを目的とするものである。

【0010】

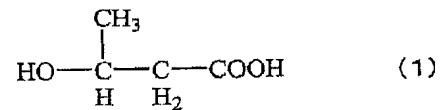
【課題を解決するための手段】本発明者らは様々な検討を行った結果、P(3HB-co-3HH)共重合体を蓄積する微生物を、油脂および/または脂肪酸を炭素源とする培地を使用して培養し、高い生産性を保持し、か

つ安定して3HHモル分率が異なる共重合体を製造することに成功した。

【0011】即ち、本発明は、微生物を用いて、下記式(1)で示される3-ヒドロキシ酪酸と下記式(2)で示される3-ヒドロキシヘキサン酸とを共重合してなる共重合ポリエステルP(3HB-co-3HH)を生産する方法であって、少なくとも2種の炭素源として、炭素数の異なる油脂の組み合わせ、炭素数の異なる脂肪酸の組み合わせ、又は、炭素数の異なる油脂と脂肪酸との組み合わせのいずれかを用いることによって、3HHモル分率の異なるポリエステルを採取するポリエステルの製造方法である。

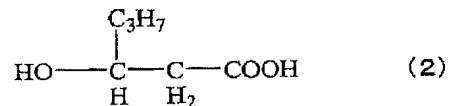
【0012】

【化3】



【0013】

【化4】



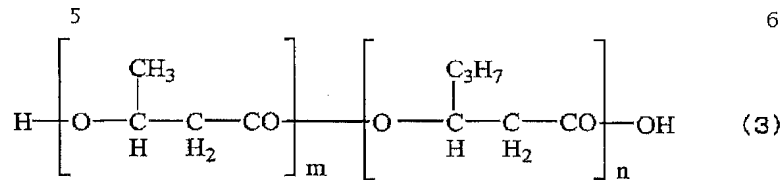
【0014】また、本発明の要旨は、P(3HB-co-3HH)共重合体を蓄積する微生物を、少なくとも2種の炭素源として、炭素数の異なる油脂の組み合わせ、炭素数の異なる脂肪酸の組み合わせ、又は、炭素数の異なる油脂と脂肪酸との組み合わせのいずれかを添加した培地で培養することで、3HHモル分率が1~40mol%の範囲のP(3HB-co-3HH)共重合体を菌体内に蓄積させ、その培養物からポリマーを採取することを特徴とする共重合体ポリエステルの製造方法に関する。以下に、本発明の詳細を説明する。

【0015】

【発明の実施の形態】本発明のポリエステルの製造方法は、微生物を用いて、上記式(1)で示される3-ヒドロキシ酪酸と上記式(2)で示される3-ヒドロキシヘキサン酸とを共重合してなる共重合ポリエステルP(3HB-co-3HH)を生産する際に適用される。上記式(1)で示される3-ヒドロキシ酪酸と上記式(2)で示される3-ヒドロキシヘキサン酸とを共重合してなる共重合ポリエステルP(3HB-co-3HH)は、例えば、下記一般式(3)に示される。

【0016】

【化5】



【0017】式中、 m 及び n は、同じか又は異なって、1以上の整数を表す。本発明のポリエステル製造方法において、使用する微生物には特に制限なく、菌株の寄託機関（例えばIFO、ATCC等）に寄託されている *Alcaligenes* (*Ralstonia*) 属や *Aeromonas* 属、*Escherichia* 属などの細菌類を使用することが出来るが、*Alcaligenes eutrophus* (*Ralstonia eutropha*) を使用することが好ましい。

【0018】また、本発明のポリエステル製造方法に用いられる微生物は、ポリエステル重合酵素遺伝子を含む組換えベクターにより、形質転換された微生物であることが好ましい。形質転換体を作製する場合はベクターには、その菌内で自立的に増殖しうるプラスミドベクターを用いることができるが、染色体に組み込まれていても良い。ポリエステル重合遺伝子は構造遺伝子のほかに、プロモーター、ターミネーターなど宿主菌で機能する発現ユニットを有していればよい。本発明のポリエステルの製造方法において用いられるポリエステル重合遺伝子は、*Aeromonas caviae* より単離された遺伝子が好ましく、例えば特開平10-108682号公報に記載されている遺伝子断片を用いることができる。

【0019】微生物に組換えベクターを導入するには、公知の方法により行うことができる。例えば、カルシウム法 (Lederberg, E. M. et al., J. Bacteriol. 119, 1072 (1974)) やエレクトロポレーション法 (Current Protocols in Molecular Biology, 1巻, 1. 8, 4頁, 1994年) 等を用いることができる。

【0020】(ポリエステルの製造方法) 本発明のポリエステルの製造方法においては、微生物を培養する際に、上記のように少なくとも2種の炭素源として、炭素数の異なる油脂の組み合わせ、炭素数の異なる脂肪酸の組み合わせ、又は、炭素数の異なる油脂と脂肪酸との組み合わせのいずれかを用い、炭素源以外の栄養源である窒素源、無機塩類、そのほかの有機栄養源を含む培地が使用できる。なお、上記炭素数の異なる油脂とは、油脂を構成する脂肪酸のうち、主要脂肪酸の炭素数が異なる油脂を意味する。培養温度はその菌の生育可能な温度であればよいが、20℃から40℃好ましい。培養時間には特に制限はないが、1～7日程度で良い。その後、得られた該培養菌体又は培養物からポリエステルを回収すればよい。また、形質転換体を使用する際は、培養中に

ベクターに存在する耐性遺伝子に対応するカナマイシン、アンピシリン、テトラサイクリン等の抗生物質を添加しても良い。

【0021】本発明のポリエステルの製造方法においては、少なくとも2種の炭素源として、炭素数の異なる油脂の組み合わせ、炭素数の異なる脂肪酸の組み合わせ、又は、炭素数の異なる油脂と脂肪酸との組み合わせのいずれかを用いることによって、3HHモル分率の異なるポリエステルを採取する。

【0022】炭素源として使用する油脂には特に制限はなく、例えば構成脂肪酸がリノール酸52%、オレイン酸21%、パルミチン酸12%、リノレン酸11%、ステアリン酸3%である大豆油、構成脂肪酸がオレイン酸59%、リノール酸22%、リノレン酸11%、パルミチン酸4%、ステアリン酸2%であるナタネ油、構成脂肪酸がリノール酸51%、オレイン酸35%、パルミチン酸11%、ステアリン酸2%であるコーン油、構成脂肪酸がオレイン酸75%、リノール酸10%、パルミチン酸10%、ステアリン酸3%、リノレン酸1%であるオリーブ油、構成脂肪酸がパルミチン酸43%、オレイン酸41%、リノール酸10%、ステアリン酸5%、ミリスチン酸1%であるパーム油、構成脂肪酸がラウリン酸47%、ミリスチン酸18%、パルミチン酸9%、オレイン酸7%、ステアリン酸3%、リノール酸2%であるヤシ油、構成脂肪酸がラウリン酸44%、オレイン酸17%、ミリスチン酸14%、パルミチン酸3%、リノール酸3%であるパーム核油などの天然物由来の油脂や、炭素数が6以上20以下の脂肪酸、例えば、ヘキサン酸、オクタン酸、デカン酸、ラウリン酸などから1種以上選択された脂肪酸とグリセロールとから合成したトリグリセリド、ジグリセリド、モノグリセリドなどがあげられる。天然物由来の油脂では炭素数12以下の脂肪酸を構成脂肪酸として40～50%含むヤシ油、パーム核油が好ましい。合成したトリグリセリド、ジグリセリド、モノグリセリドについては、構成脂肪酸はヘキサン酸が好ましい。

【0023】本発明のポリエステルの製造方法においては、上記油脂として、ヤシ油、パーム油、パーム核油及びヘキサン酸トリグリセリドからなる群より選択される油脂を用いることが好ましい。また、上記脂肪酸としてはヘキサン酸、オクタン酸、デカン酸、ラウリン酸、オレイン酸、パルミチン酸、リノール酸、リノレン酸、ミリスチン酸などの飽和または不飽和脂肪酸、これら脂肪酸のエステルや脂肪酸塩など脂肪酸誘導体が挙げられる。なかでも、炭素数が6～10である飽和または不飽

和脂肪酸、その脂肪酸エステル及び脂肪酸塩からなる群より選択される脂肪酸が好ましい。

【0024】3HHモル分率の高いポリエステルを得るためには、できるだけ炭素数の少ない脂肪酸を含む油脂、脂肪酸を用いることが好ましい。油脂では炭素数が12以下の脂肪酸を比較的多く含むヤシ油、パーム核油、ヘキサ酸トリグリセリドなどが好ましく、また脂肪酸では、炭素数が6～10である飽和または不飽和脂肪酸、その脂肪酸エステル、脂肪酸塩が好ましい。炭素数が6～10である飽和または不飽和脂肪酸、その脂肪酸エステル、脂肪酸塩のなかでも、偶数個の炭素数のものがより好ましく、炭素数6のヘキサ酸が特に好ましい。

【0025】また、本発明のポリエステルの製造方法においては、炭素源として用いる油脂または脂肪酸の添加量を変えることによって、3HHモル分率を制御することが好ましい。天然由来の油脂を炭素源とすると、3HHモル分率が10mol%よりも小さいP(3HB-co-3HH)が生産できる。3HHモル分率が10mol%より大きいP(3HB-co-3HH)を生産するためには、炭素数6～10の脂肪酸またはそのトリグリセリド、ジグリセリド、モノグリセリドを添加すれば良い。

【0026】本発明のポリエステルの製造方法においては、上記のように少なくとも2種の炭素源として、炭素数の異なる油脂の組み合わせ、炭素数の異なる脂肪酸の組み合わせ、又は、炭素数の異なる油脂と脂肪酸との組み合わせのいずれかを用い、上記油脂または脂肪酸の添加量を変えることによって、得られるポリエステルの3HHモル分率を1～40mol%の間で制御することができる。

【0027】本発明のポリエステルの製造方法において、炭素源である油脂および/または脂肪酸の添加方法としては、特に制限はない。しかし、油脂は一度に大量に添加すると培養液中の溶存酸素濃度を低下させる可能性がある。また脂肪酸は細胞毒性があるため、生育阻害を起こす可能性がある。したがって、これらの添加方法としては、生育阻害を起こさない程度の量を分割して添加する方法や、ペリスタポンプなどを使用し連続添加し、生育阻害を起こさない濃度を維持する方法などが好ましい。分割して添加する場合は、一度に添加する脂肪酸の濃度は1w/v%以下、油脂では5w/v%以下が好ましいが、特に制限されるものではない。また、添加する油脂および脂肪酸の総量は、選択した微生物の生育に影響を与えない程度であれば良く、20w/v%以下が好ましいが、特に制限されるものではない。油脂と脂肪酸とは別々のラインで添加しても良いが、相溶性がある場合は油脂と脂肪酸とを混合して添加した方が、添加ラインを減らすことができるため好ましい。

【0028】窒素源としては、例えばアンモニア、塩化

アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等のアンモニウム塩の他、ペプトン、肉エキス、酵母エキスなどが挙げられる。無機塩類としては、例えばリン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウムなどが挙げられる。

【0029】そのほかの有機栄養源としては、アミノ酸、例えばグリシン、アラニン、セリン、スレオニン、プロリンなど、ビタミン、例えばビタミンB₁、ビタミンB₁₂、ビタミンC等が挙げられる。

【0030】本発明において、ポリエステルの菌体からの回収は例えば、次のような方法が使用できる。培養終了後、培養液から遠心分離器などを用いて菌体を分離し、その菌体を蒸留水およびメタノール等により洗浄した後、乾燥させる。この乾燥菌体からクロロホルム等の有機溶剤を用いてポリエステルを抽出する。このポリエステルを含んだ有機溶剤溶液から濾過等によって菌体成分を除去し、そのろ液にメタノールやヘキサンの貧溶媒を加えてポリエステルを沈殿させる。濾過や遠心分離によって上澄み液を除去し、乾燥させてポリエステルを回収する。得られたポリエステルの分析は、例えば、ガスクロマトグラフ法や核磁気共鳴法などにより行う。

【0031】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。ただし、本発明は、これら実施例にその技術範囲を限定するものではない。

【0032】(実施例1) *Alcaligenes eutrophus* PHB-4/pJRDEE32d1株(T. Fukui., Y. Doi., Appl Microbiol Biotechnol., 49, 333-336, (1998), 受託番号FERM P-15786)(以下Aed13株と略す。)を次のように培養した。前培地の組成は1w/v% Meat-extract, 1w/v% Bacto-Trypton, 0.2w/v% Yeast-extract, 0.9w/v% Na₂HPO₄ · 12H₂O, 0.15w/v% KH₂PO₄, (pH6.7)とした。ポリエステル生産培地の組成は1.1w/v% Na₂HPO₄ · 12H₂O, 0.19w/v% KH₂PO₄, 0.6w/v% (NH₄)₂SO₄, 0.1w/v% MgSO₄ · 7H₂O, 0.5v/v% 微量金属塩溶液(0.1N塩酸に1.6w/v% FeCl₃ · 6H₂O, 1w/v% CaCl₂ · 2H₂O, 0.02w/v% CoCl₂ · 6H₂O, 0.016w/v% CuSO₄ · 5H₂O, 0.012w/v% NiCl₂ · 6H₂O, 0.01w/v% CrCl₃ · 6H₂Oを溶かしたもの。), 2w/v% プロエキスAP-12(播州調味料), 5×10⁻⁶w/v% カナマイシンとした。炭素源は油脂のみとし、パーム油、パーム核油又はヤシ油4w/v%を3回に分けて添加した。

【0033】Aed13株のグリセロールストックを前培地に接種して20時間培養し、6Lの生産培地を入れた10Lジャーファーマンター（丸菱バイオエンジニアリングMD-500型）に1.5v/v%接種した。運転条件は、培養温度30℃、攪拌速度400rpm、通気量1.8L/minとし、pHは6.6から6.8の間でコントロールした。コントロールには5規定の硫酸と水酸化ナトリウムとを使用した。培養は72時間まで行った。遠心分離によって菌体を回収し、メタノールで洗浄後、凍結乾燥し、乾燥菌体重量を測定した。

【0034】得られた乾燥菌体約30mgに2mlの硫酸-メタノール混液（15：85）と2mlのクロロホルムとを添加して密栓し、100℃で140分間加熱す*

炭素源	菌体量 (g/L)	ポリマー含量 (wt%)	3HH分率 (mol%)	ポリマー生産性 (g/L)
パーム油	35.6	35.9	5.4	12.8
ヤシ油	38.6	64.0	8.6	24.7
パーム核油	37.6	34.9	8.2	13.1

【0036】この結果から、生産性は、ヤシ油を炭素源とした場合、約24g/Lに向上することがわかった。また生産性が向上すると、特開平10-108682号公報に記載の結果とは異なり、3HHモル分率が10mol%よりも小さくなることがわかった。

【0037】（実施例2）炭素源として1）ヤシ油5w/v%、2）ヤシ油4w/v%とヘキサ酸1w/v%、3）ヤシ油3w/v%とヘキサ酸2w/v%、4）ヤシ油2w/v%とヘキサ酸3w/v%、5）ヤシ油1w/v%とヘキサ酸4w/v%、6）ヤシ油 ※

炭素源(w/v%)		菌体量 (g/L)	ポリマー含量 (wt%)	3HH分率 (mol%)	ポリマー生産性 (g/L)
ヤシ油	ヘキサ酸				
5.0	0.0	45.0	62.5	8.1	28.1
4.0	1.0	42.9	63.7	9.9	27.3
3.5	1.5	41.4	54.3	10.5	22.5
3.0	2.0	34.3	41.1	15.8	14.1
2.0	3.0	35.5	36.6	18.5	13.0
1.0	4.0	18.5	9.6	32.0	1.8
0.5	5.0	生育せず	—	—	—

【0039】この結果から、ヘキサ酸の割合が0~4w/v%に増加するにしたがって、3HHモル分率が8.1~32mol%に増加することが分かった。

【0040】（実施例3）炭素源としてヤシ油4w/v%とヘキサ酸トリグリセリド（HTG）1w/v%とを用いた。ヤシ油のみの場合は5w/v%添加した。実施例1と同様の培地を使用し、1.8Lの生産培地を入れた3Lジャーファーマンター（丸菱バイオエンジニアリングMDL-300型）を用い培養を行った。運転条件は培養温度30℃、攪拌速度550rpm、通気量1.8L/minとし、pHを6.6から6.8の間で5規定の硫酸と水酸化ナトリウムとでコントロールした。接種時にヤシ油を0.5w/v%添加し、残りのヤシ油とHTGとは混合して3等分し、接種後24、36、48時間に添加した。培養は72時間まで行った。遠心分離によって菌体を回収し、メタノールで洗浄後、凍結乾燥し、乾燥菌体重量を測定した。実施例1と同様の分析を行った。その結果を表3に示す。

＊ することで菌体内のポリエステル分解物のメチルエステルを得た。冷却後、これに1mlの蒸留水を添加し、攪拌機を用いて激しく攪拌した。静置して二層に分離させた後、下層の有機溶媒層を取り出し、その組成をキャピラリーガスクロマトグラフィーにより分析した。ガスクロマトグラフは島津製作所GC-17A、キャピラリーカラムはGLサイエンス社製NEUTRA BOND-1（カラム長25m、カラム内径0.25mm、液膜厚0.4μm）を用いた。温度条件は、初発温度100℃から8℃/分の速度で昇温した。得られた結果を表1に示す。

【0035】

【表1】

20※ 0.5w/v%とヘキサ酸5w/v%と様々に割合を変えて油脂と脂肪酸とを添加した。ヤシ油は接種時にヤシ油を0.5w/v%添加し、残りのヤシ油とヘキサ酸とは混合して約10ml/minの速度で24~60時間までの間にペリスタポンプで連続添加した。それ以外は実施例1と同様の培地・条件で培養を行い、分析を行った。その結果を表2に示す。

【0038】

【表2】

40 minとし、pHを6.6から6.8の間で5規定の硫酸と水酸化ナトリウムとでコントロールした。接種時にヤシ油を0.5w/v%添加し、残りのヤシ油とHTGとは混合して3等分し、接種後24、36、48時間に添加した。培養は72時間まで行った。遠心分離によって菌体を回収し、メタノールで洗浄後、凍結乾燥し、乾燥菌体重量を測定した。実施例1と同様の分析を行った。その結果を表3に示す。

【0041】

【表3】

11		12	
炭素源	菌体量(g/L)	ポリマー含量(wt%)	3HH分率(mol%)
ヤシ油	49.9	66.1	7.3
ヤシ油+HTG	39.9	56.5	9.8

【0042】この結果から、炭素源の一部をHTGに変更すると3HHモル分率が向上することが分かった。

【0043】(実施例4) 実施例1と同じ培地、ジャーファーメンターを使用し、同じ運転条件で培養を行った。炭素源はヤシ油4w/v%にヘキサン酸0.5w/v%

* v%またはオクタン酸0.5w/v%を混ぜて実施例1と同様に連続添加した。ヤシ油のみの場合は5w/v%添加した。分析結果を表4に示す。

【0044】

【表4】

炭素源	菌体量(g/L)	ポリマー含量(wt%)	3HH分率(mol%)
ヤシ油	49.9	66.1	7.3
ヤシ油+ヘキサン酸	45.5	57.2	8.6
ヤシ油+オクタン酸	39.8	51.1	9.0

【0045】この結果から、添加する脂肪酸を変えることで、3HHモル分率の異なるポリマーが得られた。

【0046】

【発明の効果】本発明により、生分解性ポリマーであるP(3HB-co-3HH)共重合体を、物性を大きく※

※変化させる3HHモル分率を1~40mol%の範囲で任意に制御して、高い生産性かつ安定して生産することが可能となり、応用範囲の広い本ポリマーを提供できるようになる。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	ターマート (参考)
(C 1 2 P 7/62		C 1 2 R 1:05)	
C 1 2 R 1:05)		C 1 2 N 15/00	A
(72)発明者 小田原 修		F.ターム (参考)	4B024 AA03 BA80 CA03 DA05 EA04
兵庫県高砂市西畑1丁目13番1-303			GA11
(72)発明者 松本 圭司			4B064 AD83 CA02 CA19 CB03 CC24
兵庫県西宮市大森町11-33			CD07 DA16
(72)発明者 土肥 義治			4B065 AA10Y AA12X AB01 AC14
埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所内			BA02 BB08 CA12 CA60